Aus der Strahlenabteilung des Auguste-Viktoria-Krankenhauses
Berlin-Schöneberg

Dirig. Arzt: Professor Dr.med. Walter F r o m m h o l d

U N T E R S U C H U N G E N

M I T R A D I O A K T I V E M V I T A M I N B 1 2

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans - Ulrich Pesch

aus Merseburg

1965

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546513_0038

Aus der Strahlenabteilung des Auguste-Viktoria-Krankenhauses
Berlin-Schöneberg

Dirig. Arzt: Professor Dr.med. Walter F r o m m h o l d

U N T E R S U C H U N G E N

M I T R A D I O A K T I V E M V I T A M I N B 1 2

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans - Ulrich Pesch

aus Merseburg

Dekan: Professor Dr. med. Adalbert L o e s c h k e

Referent: Professor Dr. med. Walter F r o m m h o l d

Korreferent: Professor Dr.med., Dr.rer.nat. Ernst S c h ü t t

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 17. Mai 1965

Meinen Eltern

gewidmet

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. Einleitung und Fragestellung

II. Physiologische Grundlagen

A. Geschichtliches

B. Chemie der B12-Vitamine

C. Resorption und die vitamin B12-bindenden Faktoren

D. Vorkommen und Verteilung des Vitamins B12

E. Ausscheidung des Vitamins B12

F. Funktion des Vitamins B12

III. Untersuchungsmethoden bei Vitamin B12-Mangelzuständen

A. Nicht radioaktive Untersuchungsmethoden

1. Untersuchung des Blutbildes und des Knochenmarkpunktates
2. Mikrobiologische Untersuchungsmethoden

B. Radioaktive Untersuchungsmethoden

1. Radio-Vitamin B12-Resorptions-Urinexkretions-Test
2. Radio-Vitamin B12-Resorptions-Faecesexkretions-Test
3. Radio-Vitamin B12-Resorptions-Blutkonzentrations-Test
4. Radio-Vitamin B12-Resorptions-Leberinkorporations-Test
5. Radio-Vitamin B12-Resorptions-Gesamtkörperretentions-Test

IV. Eigene Untersuchungen

A. Methodik

B. Untersuchungen über die Vitamin B12-Resorption bei partieller Gastrektomie

1. Krankengut
2. Ergebnisse
3. Diskussion der Ergebnisse

C. Untersuchungen über die Radio-Vitamin B12-Resorption nach parenteraler Applikation von inaktivem Vitamin B12

1. Krankengut
2. Ergebnisse
3. Diskussion der Ergebnisse

V. Zusammenfassung

I. Einleitung und Fragestellung.

Das Krankheitsbild, das durch eine fehlende oder unzureichende Versorgung des menschlichen Organismus mit dem Vitamin B12 entsteht, ist die perniziöse Anämie. Die wichtigste Rolle in der Pathogenese dieser Krankheit spielt eine Störung der Resorption des Vitamins im Magen-Darm-Kanal, sei es durch ein Ausbleiben der "intrinsic factor"-Produktion in der Magenschleimhaut, sei es durch besondere pathologisch-anatomische Verhältnisse des Intestinaltraktes (Blindsäcke, innere Fisteln, Strikturen, Gastrektomie, Dünndarmresektionen), sei es durch funktionelle Defekte im Bereiche der Darmschleimhaut (Sprue, Steatorrhoe) oder durch den Fischbandwurmbefall[1]. Unter Verwendung von radioaktivem Vitamin B12 ist es heute relativ leicht möglich, die Resorptionsverhältnisse für dieses Vitamin zu prüfen. Es sind mehrere Untersuchungsmethoden, die sich des radioaktiv markierten Vitamins B12 bedienen, beschrieben worden (s. Teil III).
Die Untersuchungen, über die in dieser Arbeit berichtet werden soll, wurden mit Hilfe des Radio-Vitamin B12-Resorptions-Urinexkretions-Testes nach Schilling durchgeführt.
Im Folgenden soll versucht werden, zu der Frage Stellung zu nehmen, wie weit ein Patient mit partieller Gastrektomie nach Billroth II in der Lage ist, das peroral zugeführte Vitamin B12 zu resorbieren. Dies erschien wichtig, da in einer Arbeit von I.Boll und H.G.Mehl[2] diese Frage aufgeworfen, jedoch infolge Mangels an entsprechendem Patientenmaterial nicht zu Ende geführt wurde.
Da heutzutage viele schon anbehandelte Fälle von Megaloblastenanämie und besonders Patienten mit funikulären Spinalerkrankungen, die bereits hohe Dosen von Vitamin B12 bekommen haben, zur Durchführung eines radioaktiven Vitamin B12-Testes kommen, stellte sich im Laufe meiner Untersuchungen die Frage, ob durch parenterale Applikation von inaktivem Vitamin B12 der Ablauf des Radio-Vitamin B12-Testes beeinflußt werden und damit eventuell das Ergebnis falsch gedeutet werden kann. An Hand mehrerer daraufhin untersuchter Fälle sollen im letzten Abschnitt dieser Arbeit die gewonnenen Resultate wiedergegeben und erörtert werden.

II. Physiologische Grundlagen.

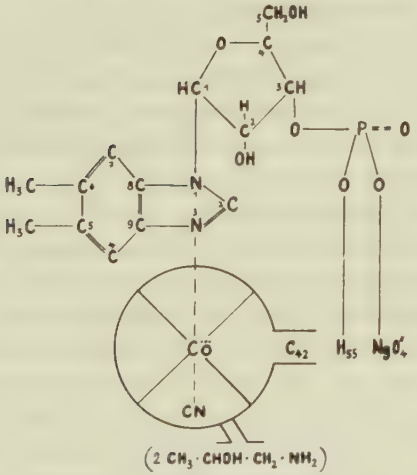
A. Geschichtliches.

Schon im vorigen Jahrhundert konnte unter den zahlreichen Formen der Anämien eine Form herauskristallisiert werden, die früher regelmäßig mit tödlichem Ausgang verlief und daher auch als perniziöse Anämie bezeichnet wurde. Sie ist in Deutschland zuerst von Anton Biermer im Jahre 1868 ausführlich beschrieben worden. Die Krankheit wird charakterisiert durch eine Störung der Erythropoese, die sich im Auftreten von abnorm großen, stark mit Hämoglobin beladenen Erythrozyten, den Megalozyten, kundtut. Weiterhin findet man eine Glossitis, eine fehlende Magensekretion und häufig Symptome seitens des Zentralnervensystems (funikuläre Spinalerkrankung).
Heute unterscheidet man bei der Perniziosa eine kryptogene Form (die eigentliche Biermersche Anämie) und solche mit bekannter Ursache, wie die hyperchrome Anämie bei Gravidität, bei Sprue, bei Magenresektion, bei Botriocephalusträgern und nach Dünndarmresektionen und -strikturen[3].
Von entscheidender Bedeutung in der Behandlung der perniziösen Anämie war die Entdeckung von Minot und Murphy im Jahre 1926, daß durch Verabfolgung großer Mengen roher Leber die Krankheit weitgehend symptomfrei gemacht werden kann[4]. Man nahm an, daß die Leber eine Substanz enthält, durch deren Fehlen offenbar die Perniziosa bedingt ist. Man wußte allerdings noch nicht, ob es sich bei diesem Stoff um einen Nahrungsfaktor handelt, den der Perniziosakranke nicht mehr verwerten kann oder um einen Faktor, der von den Kranken nicht mehr gebildet werden kann. Einen Schritt weiter kam man durch die Untersuchung von Castle, der zeigen konnte, daß die Verabfolgung von Fleisch zusammen mit normalem menschlichen Magensaft die Perniziosa klinisch und hämatologisch bessern konnte[5]. Bei der Applikation einer dieser Faktoren alleine wurde dieser Effekt nicht beobachtet. Damit entstand die Auffassung von einem in der Nahrung vorhandenen Stoff, dem "extrinsic factor", und einem vom Organismus gebildeten Stoff, dem "intrinsic factor". Im Jahre 1948 gelangen Rickes

und seinen Mitarbeitern die Isolierung des hämatopoetisch wirksamen Inhaltsstoffes der Leber bei perniziöser Anämie[6]. Diese Substanz ist der mit der Nahrung zugeführte "extrinsic factor", der die Bezeichnung Vitamin B12 erhalten hat.

B. Chemie der B12-Vitamine

Das Vitamin B12 ist ein organischer Kobaltkomplex. Es enthält 4,5% Kobalt und ist als Co-Verbindung rot gefärbt, weshalb es auch Erythrotin genannt wird. Es besteht unter



1-alpha-D-Ribofuranosido-5,6-dimethylbenzimidazolphosphat (= alpha-Ribazolphosphat)

Kobalthaltige "Rote Säure"

D-1-Amino-2-propanol

Abbildung 1

anderem aus einem komplex an das Kobalt gebundenen CN-Rest, der durch andere einwertige Anionen ersetzt werden kann. Diese Verbindungen bezeichnet man als Cobalamine; Vitamin B12 ist demnach das Cyanocobalamin[7]. Die Abbildung 1 gibt einen Überblick über die Komponenten der Vitamin B12-Struktur[8]. In letzter Zeit fand man neben dem Vitamin B12 noch

andere Substanzen von ähnlichem chemischen Bau, wie die Pseudovitamine B12 und B12b und die Kotfraktionen A und B aus Kalbsfaeces[9].

Die verschiedenen B12-Vitamine unterscheiden sich chemisch in der Struktur des Nucleotidanteiles voneinander[10]:

Cyanocobalamin (=B12):	5,6-Dimethylbenzimidazol
Pseudovitamin B12:	Adenin (=6-Aminopurin)
Kotfraktion "G": (Desaminierungsprodukt des Pseudovitamins B12)	Hypoxanthin (=6-Hydroxypurin)
Kotfraktion A:	2-Methyladenin (=2-Methyl-6-Aminopurin)
Kotfraktion "H": (Desaminierungsprodukt der Kotfraktion A)	2-Methylhypoxanthin (=2-Methyl-6-Hydroxypurin)
Kotfraktion B:	ohne Nucleotidkomponente

Diese Substanzen, die von der Darmflora gebildet werden, haben für den Menschen zur Bedarfsdeckung an Vitamin B12 keine Bedeutung, da beim Menschen in den betreffenden Darmabschnitten eine Resorption nicht möglich ist[10]. Außerdem haben sich diese Stoffe bei der Perniziosa als inaktiv erwiesen[7]. Für den Wirtsorganismus kommt ihnen insofern eine Bedeutung zu, als sie für die Lebensfähigkeit der mit ihm in Symbiose lebenden, vitamin B12-bedürftigen Mikroorganismen Sorge tragen.

C. Resorption und die vitamin B12-bindenden Faktoren.

Nach peroraler Verabreichung des Vitamins B12 tritt nur dann eine im physiologischen Bereich liegende Resorption auf, wenn der Castle'sche "intrinsic factor" vorhanden ist. Eine geringfügige Resorption beobachtet man nur dann ohne "intrinsic factor", wenn das Vitamin B12 in Größenordnungen von Milligramm gegeben wird[10].

Heute wird angenommen, daß die Passage des Vitamins B12 durch die Darmwand mit Hilfe des "intrinsic factors" ermöglicht wird. Da der Faktor die Fähigkeit besitzt, das Vitamin B12 zu binden, kann man sich vorstellen, daß die Absorption dieses Vitamins in Form eines Komplexes erfolgt[7].

Die Bildungsstätte für den "intrinsic factor" ist der Magen. Nach Untersuchungen an partiell Magenresezierten konnte festgestellt werden, daß die Antrumschleimhaut die geringste und der Corpusabschnitt des Magens die größte "intrinsic factor"-Produktion aufweisen. Im Bereiche der Fundusschleimhaut konnte man eine mäßig starke "intrinsic factor"-Aktivität erkennen[11]. Die Pathogenese der perniziösen Anämie ist heute dahingehend geklärt worden, daß die Magenschleimhaut des Perniziosakranken nicht mehr in der Lage ist, den "intrinsic factor" zu produzieren, und somit das Vitamin B12 vom Darm aus nicht mehr resorbiert werden kann.
Über die chemische Struktur des "intrinsic factors" bestehen noch keine klaren Vorstellungen. Nach Glass und Mitarbeitern soll der "intrinsic factor" 12,6% Stickstoff, 7,5% Tyrosin sowie Hexuronsäure und Hexosamin enthalten[12].
Es gibt noch andere im Magen vorhandene vitamin B12-bindende Faktoren, wie zum Beispiel die Apoerytheine und das glanduläre Mucoprotein. Es wurde angenommen, daß diese Stoffe mit dem "intrinsic factor" identisch sind; jedoch ist diese Identität nicht erwiesen[10]. Spray inkubierte neutralisierten menschlichen Magensaft 22 Stunden bei 37°C mit Vitamin B12 und erhitzte anschließend 20 Minuten lang auf 95°C. Dabei ging bei oraler Applikation am Perniziosakranken die hämatopoetische Wirksamkeit des Magensaftes verloren, während die Bindung des Vitamins B12 an B12-bindende Faktoren nicht aufgehoben war[13]. Demnach existiert noch eine Verbindung zwischen dem Vitamin B12 und den B12-binden Faktoren im Magen, wenn die Bindung an den "intrinsic factor" nicht mehr vorhanden ist. Das glanduläre Mucoprotein, das aus dem sauren Magensaft Gesunder isoliert wurde, zeigte eine gewisse Ähnlichkeit mit dem "intrinsic factor" in seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften[14].
Heinrich und Lahann nehmen an, daß der "intrinsic factor" im glandulären Mucoprotein an das größere Trägermolekül adsorbiert oder auch als Wirkungsgruppe in ihm vorliegt, weil das glanduläre Mucoprotein eine relativ geringe spezifische Aktivität besitzt (50 mg glanduläres Mucoprotein sind für die Resorption von 30 gamma Vitamin B12 notwendig)[10]. Ist das

Vitamin B12 an die eben beschriebenen Faktoren gebunden, so liegt es in einer für die Mikroorganismen nicht verwertbaren Form vor[10].

D. Vorkommen und Verteilung des Vitamins B12.

Das in der Natur aufgefundene Vitamin B12 ist ausschließlich mikrobieller Herkunft[10]. In besonders großen Mengen wird das Vitamin B12 von den Pilzen Streptomyces griseus und Streptomyces aureofaciens gebildet. Da die synthetische Herstellung dieses Vitamins bis heute noch nicht gelungen ist, geht die technische Großherstellung von Streptomyces griseus-Kulturen aus. Letztere haben sich für die Gewinnung des Vitamins B12 viel ergiebiger erwiesen als die tierische Leber[15].
Der absolute Tagesbedarf an Vitamin B12 liegt beim Menschen bei 0,1-1 gamma[16]. Das Vitamin B12 wird unter physiologischen Bedingungen nach der Resorption auf dem Blutwege verteilt und in die Organe eingelagert. Im Serum liegt das Vitamin B12 teils in gebundener, teils in freier Form vor. Etwa 80-95% des Gesamt-Vitamins B12 sind im Serum an die Proteine gebunden und nicht dialysierbar[10]. 50% des gebundenen Vitamins B12 sind an die $alpha_1$-Globuline, die restlichen 50% an die Albumine, $alpha_2$-, beta- und gamma-Globuline gebunden[17]. Die Form der Serumbindung ist entscheidend für das Schicksal des Vitamins B12 hinsichtlich der Organretention und Exkretion.
Der Gesamt-Vitamin B12-Spiegel im Serum beträgt 62-460 mikrogamma/ml; davon sind 1-30 mikrogamma/ml freies Vitamin B12[8]. Er unterliegt bis zu 500% betragenden uncharakteristischen Schwankungen[10].
Von dem Vitamin B12-Gehalt einer natürlichen Diät ist der Vitamin B12-Spiegel des Gesunden und des Perniziosakranken weitgehend unabhängig[18]. Es ist von Bedeutung, ob das Vitamin B12 peroral oder parenteral zugeführt wird, weil es nach parenteraler Applikation hauptsächlich in freier Form vorliegt und rasch wieder ausgeschieden wird, während das über den Magen-Darm-Kanal in das Serum gelangte Vitamin B12 vorwiegend an die Serumproteine gebunden und in die Organe eingelagert wird[10]. Das freie Vitamin B12 fällt demnach we-

sentlich leichter der Exkretion durch die Niere anheim als das gebundene.
Vitamin B12 findet sich in fast allen Organen des Organismus. In der Leber, Niere, Nebenniere, im Gehirn, Hoden und Muskel des Meerschweinchens ist es nachgewiesen worden[19]. Den höchsten Vitamin B12-Gehalt tierischer Organe weist die Leber auf; ihr Vitamin B12-Depot beträgt etwa 200 gamma[20]. Die Vitamin B12-Reserven im menschlichen Organismus betragen ungefähr 200-1000 gamma[21]. Die Organe können das gespeicherte Vitamin B12 wieder abgeben. Bei einer Vitamin B12-Mangelsituation (geringe Zufuhr, Resorptionsstörung) sinkt der Vitamin B12-Gehalt der verschiedenen Organe stark ab[10]. Innerhalb der Zelle liegt das Vitamin B12 in den Mitochondrien vor[22].
Die Placenta ist durchlässig für Vitamin B12. Nach der Geburt sind in den Organen des Neugeborenen für eine gewisse Zeit ausreichende Vitamin B12-Vorräte gespeichert worden[10]. Während der Gravidität und der Laktation erhöht sich der Bedarf an Vitamin B12 von 0,1-1 gamma/die auf 5-10 gamma/die. Bei etwa 20% der Frauen entwickelt sich ein gewisser Vitamin B12-Mangelzustand, da mit der Nahrung nur etwa 0,2-3,5 gamma/die zugeführt werden[16].

E. Ausscheidung des Vitamins B12.

Die Ausscheidung des Vitamins B12 erfolgt mit dem Urin, den Fäces, der Milch und dem Speichel[10]. Patienten mit perniziöser Anämie scheiden im Harn wesentlich weniger Vitamin B12 aus als Gesunde[10]. Wenn man das Vitamin B12 injiziert, kommt es fast gleichzeitig mit dem Anstieg des freien Vitamins B12 im Serum zu einer starken Ausscheidung mit dem Urin[10].
Das mit dem Stuhl ausgeschiedene Vitamin B12 setzt sich zusammen aus dem aus der Nahrung nicht resorbierten und dem von der normalen Darmflora gebildeten Vitamin B12; das endogen gebildete Vitamin B12 überwiegt jedoch bei weitem. Demzufolge ist auch beim Perniziosakranken kein großer Unterschied zum Gesunden bezüglich der Vitamin B12-Ausscheidung mit den Fäces festzustellen[10].

Die Exkretion des Vitamins B12 mit der Milch ist beim Menschen nicht konstant. Während der ersten Tage post partum kommt es zu einem starken Abfall des Vitamin B12-Gehaltes der Milch[10].

Der Gehalt des Speichels an Vitamin B12 ist unterschiedlich. Beim Perniziosakranken beobachtet man starke Erniedrigungen, aber auch der Speichel des Gesunden enthält oft nur geringste Mengen[10].

F. Funktion des Vitamins B12.

Es sind verschiedene Funktionen des Vitamins B12 im Stoffwechsel bekannt geworden. Nach Leuthardt soll die Wirkung des Vitamins B12 im Stoffwechsel der C_1-Fragmente (=im intermediären Stoffwechsel entstehende Spaltprodukte, die nur ein Kohlenstoffatom enthalten, wie z.B. CH_3-) am besten gesichert sein[7]. Es ist für die Bildung labiler Methylgruppen aus den im Stoffwechsel anfallenden Einkohlenstoffverbindungen notwendig. Ratten und Hühnchen, deren Nahrung kein Methionin, jedoch das Homocystein (=die methylfreie Vorstufe des Methionins) enthielt, wuchsen nur dann, wenn ihnen gleichzeitig Vitamin B12 und Folsäure gegeben wurde[23]. Durch Vitamin B12 wird die Überführung des alpha-Kohlenstoffatoms des Glycocolls in die Methylgruppen des Cholins sehr gefördert[24].

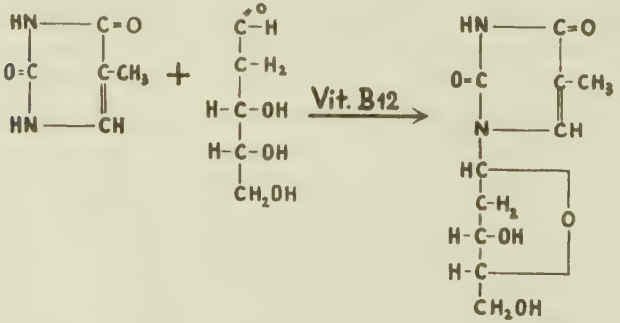


Abbildung 2

Weiterhin soll das Vitamin B12 in die Synthese der Nucleinsäuren in Form eines Katalysators eingreifen können[15]. Knochenmark und Zentralnervensystem weisen den größten Nucleinsäureumsatz auf[25]. Die Wirkung des Vitamins B12 auf die Erythropoese könnte nun daraus verständlich werden, weil im Knochenmark das erythropoetische System der stärksten Zellproliferation unterworfen ist[15]. Das Vitamin B12 soll in den Aufbau der Nucleinsäuren in der Weise eingreifen, daß

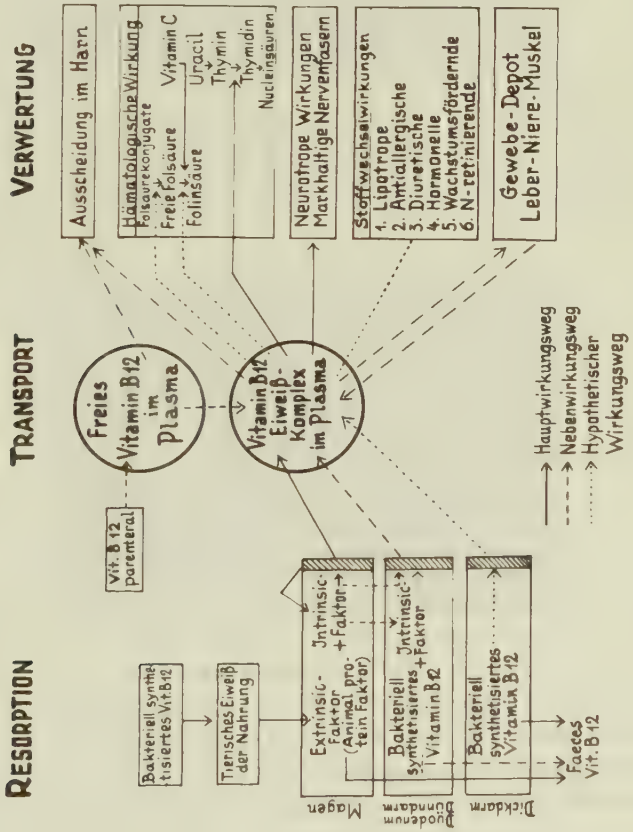


Abbildung 3

es an der Synthese des Nucleosids Thymidin aus Thymin und Desoxyribose beteiligt ist[15]. (s. Abb. 2)
Abschließend zu diesen Betrachtungen soll in der Abbildung 3 ein Schema von Finch[20] wiedergegeben werden, das das eben Beschriebene in übersichtlicher Weise zusammenfaßt.

III. Untersuchungsmethoden bei Vitamin B12-Mangelzuständen.

In der Diagnostik der Vitamin B12-Mangelzustände sind verschiedene Vitamin B12-Bestimmungstests entwickelt worden, die trotz Fehlens der typischen Veränderungen im Blutbild und Knochenmark bei Vitamin B12-Mangel (z.B. eingeleitete Behandlung, funikuläre Spinalerkrankung) eine genaue Differenzierung des Zustandsbildes gestatten. Neben den mikrobiologischen Methoden, die an das Vorhandensein eines speziell eingerichteten Laboratoriums gebunden und deshalb nicht überall einzuführen sind, haben vor allem die durch die Etikettierung des Vitamins B12 mit radioaktivem Kobalt entwickelten Tests weite Verbreitung gefunden.

A. Nicht radioaktive Untersuchungsmethoden.

1. Untersuchung des Blutbildes und des Knochenmarkpunktates.

Das Fehlen von Vitamin B12 dokumentiert sich durch charakteristische Veränderungen des Blut- und Markbildes. Die Zahl der Erythrozyten (normal 4,5-5 Mill./mm^3 Blut) ist stärker vermindert als das Hämoglobin, weshalb man auch von hyperchromer Anämie spricht. Im peripheren Blut findet man abnorm große, gut gefärbte Erythrozyten, die Megalozyten, sowie deren Vorstufen, die im Durchmesser bis über 12 my messenden Megaloblasten. Regelmäßig kann man eine Vergrößerung des durchschnittlichen Durchmessers der Erythrozyten auf 8 my und darüber (normal 7,3-7,6 my) beobachten. Wie bei anderen schweren Anämien sieht man an den Erythrozyten eine Anisozytose, Ovalozytose und Poikilozytose. Das Blutserum ist dunkler als normal. Der Eisenspiegel im Serum liegt im Bereich der Norm oder etwas höher.

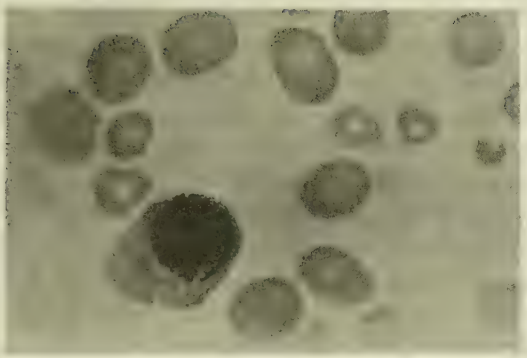


Abbildung 4
(Peripheres Blut bei Morbus Biermer: Polychromatischer Megaloblast. Anisozytose, Ovalozytose, Poikilozytose[26].)

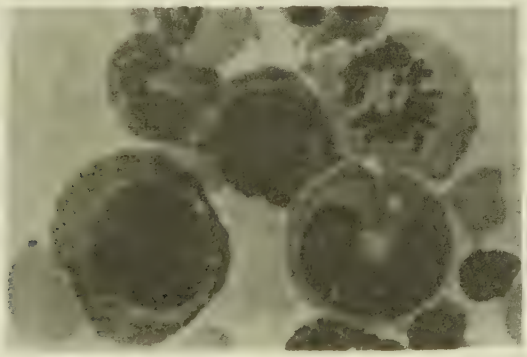


Abbildung 5
(Sternalpunktat bei Morbus Biermer: In der Diagonale von links unten nach rechts oben: Promegaloblast, Megaloblast, Mitose eines polychromatischen Megaloblasten (Metaphase). Rechts unten: Neutrophiler Metamyelozyt (Riesenform der Granulozyten bei Morbus Biermer)[26].)

Die Senkungsgeschwindigkeit ist stets, häufig sogar sehr erheblich beschleunigt. Von großer Bedeutung ist das Ver-

halten der Retikulozyten, der jugendlichen Erythrozyten, die durch eine als Substantia reticulofilamentosa bezeichnete fädig- netzartige Struktur gekennzeichnet sind. Ihre Zahl ist zunächst normal (1-50‰) oder subnormal, steigt aber bei Vitamin B12-Gabe stark an (bis über 30‰). Diesen Effekt bezeichnet man als Retikulozytenkrise; er hat seinen Höhepunkt zwischen dem 4. und 9. Tag nach Beginn der Vitamin B12-Therapie. Die Leukozyten, deren Kerne eine abnorm starke Segmentation aufweisen, sind vermindert, desgleichen die Blutplättchen. Die Leukopenie geht auf Kosten der Granulozyten; es besteht also eine relative Lymphozytose.
Eine große diagnostische Bedeutung kommt dem Knochenmarkpunktat zu. Es herrschen bestimmte kernhaltige Vorstufen der Erythrozyten vor. Man findet statt der sonst vorhandenen Normoblasten reichliche Megaloblasten und deren Vorformen, die Promegaloblasten, die sich durch ein stark basophiles Protoplasma auszeichnen. An den Megaloblasten fällt bei reifem Protoplasma eine lockere Kernstruktur auf; die Kernentwicklung bleibt zurück. Unter den Leukozyten finden sich auffallend große Zellen mit Stabkernen. Die Megakaryozyten sind in der Regel vermindert. Unter Vitamin B12 erfolgt in kürzester Zeit ein Umschlag des Markbildes mit Wiedererscheinen der normalen Zellen, sodaß im Remissionsstadium eine Diagnose aus dem Knochenmarkpunktat nicht mehr möglich ist. (Teil III, A, 1: Literaturangabe 3)

2. Mikrobiologische Untersuchungsmethoden.

Patienten mit einer perniziösen Anämie zeigen eine starke Erniedrigung ihres Serum-Vitamin B12-Spiegels, sowohl an gebundenem wie an freiem Vitamin B12. Sie enthalten im Serum 0,01-30 (im Mittel 5) mikrogamma/ml Gesamt-Vitamin B12,davon liegen 0,000-0,6 mikrogamma/ml in freier Form vor[8]. Megaloblastenanämien, die durch einen Folsäuremangel bedingt sind, haben einen normalen Serum-Vitamin B12-Spiegel, sodaß auf Grund dieser Tatsache eine differentielle Diagnostik und damit eine gezielte Therapie (Vitamin

B12 oder Folsäure) ermöglicht wird. Da das Vitamin B12 im Serum starken Schwankungen unterworfen ist, hat eine einmalige Vitamin B12-Bestimmung keine Bedeutung, sondern es ist ein Ein- oder Mehrtagesrelief notwendig[10]. Auch im Harn des Perniziosakranken ist weniger Vitamin B12 nachweisbar als im Harn des Gesunden. Die Exkretion mit dem Urin beträgt beim Gesunden 50-250 milligamma Vitamin B12/die, während der Perniziosakranke nur 0,00015-20 milligamma Vitamin B12/die ausscheidet[18].

Die Vitamin B12-Bestimmung im Serum und der quantitative Nachweis von Vitamin B12 im Harn geschieht auf mikrobiologischem Wege. Verschiedene Mikroorganismen benötigen zu ihrem Wachstum Vitamin B12. Diese Tatsache hat man sich zur quantitativen Bestimmung des Vitamins B12 zu Nutze gemacht. Milchsäure-Bakterien-Wachstumsteste, Escherichia coli-Wachstumsteste und Flagellaten-Wachstumsteste werden z.B. verwendet. Der Durchmesser der Wachstumszonen oder bestimmte Reaktionsprodukte - beispielsweise die von den Milchsäurebakterien gebildete Milchsäure - lassen Rückschlüsse auf die vorhandene Menge an Vitamin B12 ziehen[10]. Die Fehlermöglichkeiten dieser verschiedenen Teste sind jedoch sehr groß, weil sie zum Teil unspezifisch sind, und verschiedene Aminosäuren und Nucleinsäuren den Ablauf der Teste stören. Am geringsten sind die Fehlerquellen bei den Flagellaten-Wachstumstesten[10].

In diesem Zusammenhang soll ein von Heinrich und Mitarbeitern entwickelter Vitamin B12-Stoffwechseltest erwähnt werden, der

> "Parenterale Vitamin B12-Retentions-Exkretions-Test (Parenteraler B12-RET)"[27].

Bekommt ein Gesunder mit normalem Vitamin B12-Stoffwechsel 30 gamma Vitamin B12 injiziert, so steigt nach ein bis drei Stunden die Gesamt-Vitamin B12-Fraktion im Serum auf 800-3000 mikrogamma/ml an, das freie Vitamin B12 im Serum auf 500-2900 mikrogamma/ml. Der Ausgangswert an Gesamt-Vitamin B12/ml vor der parenteralen Belastung ist nach 24-30 Stunden wieder erreicht. Während der ersten

6-8 Stunden nach der parenteralen Gabe der Testdosis von 30 gamma Vitamin B12 scheiden Gesunde 1-7 (im Mittel 4) gamma Vitamin B12 mit dem Harn wieder aus. Bei Patienten, die sich in einem Vitamin B12-Mangelzustand befinden, beobachtet man 1-3 Stunden nach der parenteralen Gabe von 30 gamma Vitamin B12 einen Anstieg der Gesamt-Vitamin B12-Konzentration im Serum auf nur 130-450 mikrogamma/ml, des freien Vitamins B12 im Serum auf 1- 370 mikrogamma/ml. Bei einem kleinen Teil der Patienten ist der Serumspiegel an Vitamin B12 1-5 Tage nach der Belastung wieder auf den Ausgangswert abgesunken, bei dem größeren Teil finden sich jedoch dann Vitamin B12-Serum-Konzentrationen, die bei 5-20% des schon erniedrigten Ausgangswertes liegen. Mit dem Harn werden während der ersten 6-8 Stunden nach der Belastung nur 105-679 milligamma Vitamin B12 ausgeschieden. Die Vitamin B12-Bestimmungen im Blut und im Spontanharn wurden mittels der Phytoflagellaten "Euglena gracilis var. bacillaris" und "Euglena gracilis isol. T.", sowie mit den Chrysomonaden "Ochromonas malhamensis Pringsheim" und "Ochromonas malhamensis Lewin" durchgeführt. Eine Unterscheidung zwischen endogenen und exogenen B12-Vitaminen sowie zwischen freiem, peptid- und proteingebundenem Vitamin B12 wird durch die kombinierte Testung mittels der Euglenen und Chrysomonaden ermöglicht.

B. Radioaktive Untersuchungsmethoden.

Wie die Herstellung von Vitamin B12 von Streptomyces-griseus-Kulturen ausgeht, so gelingt auch auf diesem Wege die Gewinnung radioaktiv markierten Vitamins B12. Setzt man den Nährlösungen Radiokobalt zu, so wird es von Streptomyces griseus und Bacillus subtilis in das Cyanocobalamin eingebaut[28]. Durch direkten Neutronenbeschuß des nicht markierten Vitamins B12 gelingt im Kernreaktor die Präparation des mit dem Radiokobalt 60 markierten Vitamins B12[29].
Neben dem langlebigen Co^{60} ($T^{1}/_{2}$=5,3a) konnten in den letzten Jahren auch die kurzlebigeren Isotope Co^{58} ($T^{1}/_{2}$=72d), Co^{57} ($T^{1}/_{2}$=270d) und Co^{56} ($T^{1}/_{2}$=72d) zur Mar-

kierung des Vitamins B12 verwendet werden[2].
Mit den verschiedenen Radio-Vitamin B12-Testen wird die intestinale Vitamin B12-Resorption geprüft. Die Teste unterscheiden sich lediglich dadurch, daß das oral gegebene Radio-Vitamin B12 entweder im Stuhl oder Urin oder innerhalb des Organismus wieder nachgewiesen wird. Unabhängig davon, mit welchem der Radio-Vitamin B12-Teste gearbeitet wird, gilt es, folgende Hinweise zu beachten[30]:
1.) Es müssen vor der Testung alle Substanzen, die den physiologischen Ablauf der intestinalen Vitamin B12-Resorption stören könnten (z.B. vitamin B12- oder "intrinsic factor"-haltige Präparate, Fermentpräparate, Abführmittel), abgesetzt werden.
2.) Der Patient darf keine anderen radioaktiven Substanzen bekommen, die von den verwendeten Strahlungsdetektoren erfaßt werden.
3.) Die Radio-Vitamin B12-Testdosis soll möglichst im physiologischen Bereich der intestinalen Vitamin B12-Resorption liegen, d.h. 1 gamma nicht überschreiten.
4.) Nach extrem hoher parenteraler Vitamin B12-Therapie muß mit den Radio-Vitamin B12-Testen etwa eine Woche gewartet werden (Auf diese Frage wird im IV. Abschnitt dieser Arbeit ausführlich eingegangen).
5.) Die Radio-Vitamin B12-Teste sollten zweimal, einmal ohne und einmal mit "intrinsic factor"-Zugabe durchgeführt werden, um die differentialdiagnostischen Möglichkeiten auszuschöpfen.

1. Radio-Vitamin B12-Resorptions-Urinexkretions-Test (Radio-B12-UET).

Den Patienten wird in nüchternem Zustand eine Radio-Vitamin B12-Testdosis oral verabfolgt. Nach etwa 2 Stunden werden ihnen 1000 gamma inaktives Vitamin B12, die sog. Sättigungs- und Ausschwemmdosis, intramuskulär injiziert. Im Urin, der über 24 Stunden zu sammeln ist, kann dann ein Teil des intestinal resorbierten radioaktiven Vitamins B12 wieder nachgewiesen werden.
Schilling, der diesen Test im Jahre 1953 angegeben hat,

verwendete als orale Testdosis 2 gamma Co^{60}-markiertes Vitamin B12 mit einer Aktivität von 0,49 Mikro-Curie[31].

Die parenterale Sättigungs- und Ausschwemmungsdosis von 1000 gamma inaktivem Vitamin B12 hat die Aufgabe, alle vitamin B12-bindenden Faktoren im Plasma sowie in den Organen mit nicht radioaktivem Vitamin B12 abzusättigen, damit ein möglichst großer Teil des intestinal resorbierten Radio-Vitamins B12 über die Niere ausgeschieden und nicht an den Serumproteinen gebunden oder in den Organen retiniert werden kann[30]. Die Verabfolgung dieser Dosis hat daher zu einem Zeitpunkt zu erfolgen, in dem der größte Teil des intestinal resorbierten Radio-Vitamins B12 in die Intestinalmukosa inkorporiert ist und beginnt, in den Blutkreislauf überzutreten (etwa 2-6 Stunden nach der oralen Belastung)[30]. Die durch die Sättigungs- und Ausschwemmungsdosis bewirkte Radio-Vitamin B12-Urinexkretion hat nach 6-12 Stunden ihren Höhepunkt erreicht[32]. Die Voraussetzung für die Durchführbarkeit des Radio-B12-UET ist eine normale Nierenfunktion. Wenn experimentell unphysiologisch hohe Konzentrationen an freiem Vitamin B12 im Serum durch intravenöse Infusion aufrechterhalten werden, so tritt das freie Vitamin B12 aus dem Blut durch Glomerulusfiltration in den Primärharn über und wird nicht rückresorbiert[33]. Bei Nierenerkrankungen, die mit einer gestörten Glomerulusfiltration einhergehen (chron. Glomerulonephritis, chron. Pyelonephritis, Nephrosklerose, Amyloidniere), wurden bei Anwendung des Radio-B12-UET sehr niedrige Harnexkretionen an Radio-Vitamin B12 festgestellt[34]. Auch beim Vorliegen akuter Infektionskrankheiten kann der Radio-B12-UET zu falschen Ergebnissen führen, da hier eine stark herabgesetzte Radio-B12-Resorption beobachtet wurde, die sich jedoch nach Entfieberung wieder normalisierte[35].

Die im Harn ausgeschiedene Aktivitätsmenge wird in Prozent der Aktivität der oralen Testdosis angegeben. Schilling und Mitarbeiter fanden bei 35 Patienten mit perniziöser Anämie im 24-Stunden-Urin Werte zwischen 0,0 und 2,3% (im Mittel 0,6%) und bei 18 Normalpersonen Werte zwischen

7 und 22% (im Mittel 14,2%)[36]. Wiederholt man bei Perniziosapatienten den Test mit Zugabe eines "intrinsic factor"-Präparates, so steigt die Ausscheidung gegenüber dem ersten Test an. Pribilla und Mitarbeiter fanden bei 10 Patienten mit Perniziosa im 24-Stunden-Urin 0,0-3,0% (im Mittel 0,6%) der Testdosis und bei Wiederholung des Testes mit "intrinsic factor" 7,2-23,7% (im Mittel 15,1%)[1]. Liegt die Ursache einer verminderten Vitamin B12-Resorption nicht in einem Fehlen des "intrinsic factors", sondern z.B. in der Sprue oder Dünndarmstrikturen, so ist natürlich bei einem zweiten Test mit "intrinsic factor"-Zugabe nicht mit einem Anstieg der Radio- Vitamin B12-Urinexkretion zu rechnen. Ein Normalbefund kann wohl bei einer Ausscheidung von 10% und darüber angenommen werden[1]. Bei niederen Werten sollte ein zweiter Test mit "intrinsic factor" durchgeführt werden.
Fehlermöglichkeiten sind bei Anwendung des Radio-B12-UET durch den von Seiten des Patienten und des Hilfspersonals verschuldeten Verlust von Harnfraktionen und durch das Ausbleiben bzw. nicht zeitgerechte Verabfolgen der parenteralen Sättigungs- und Ausschwemmungsdosis gegeben.

Vorteile des Radio-B12-UET sind das einfache direkte Messen der Harnaktivität und die kurze Testdauer.

2. Radio-Vitamin B12-Resorptions-Faecesexkretions-Test (Radio B12-FET)[30) 37].

Nach Verabfolgen der oralen Testdosis von 0,1-1 gamma Radio-Vitamin B12 wird der Stuhl in 24 Stunden-Fraktionen auf Ölpapier gesammelt, bis mindestens zwei aufeinanderfolgende Faecesfraktionen wieder inaktiv geworden sind. Um eventuell vorhandene radioaktive Substanzen auszuschließen, wird mit der Faecessammlung schon 1-2 Tage vor Beginn des Testes begonnen. Die notwendige Testdauer beträgt 5-8 Tage. Sie darf nicht durch laxierend wirkende Präparate abgekürzt werden, da sonst der physiologische Ablauf der intestinalen Vitamin B12-Resorption gestört werden kann. Nach Zusatz von je nach Faecesvolumen und -konsistenz unterschiedlichen Wassermengen werden die

einzelnen Faecesfraktionen zusammen mit dem Ölpapier in einem entsprechenden Gefäß homogenisiert. Die entstandene Suspension darf nicht sedimentieren, sie muß mindestens für die Zeit der Radioaktivitätsmessung stabil bleiben.
Die Radiokobalt-Ausscheidung wird in Prozent der Testdosis angegeben. Durch Abzug dieses Wertes von der oralen Testdosis (=100%) wird die eigentliche intestinale Radio-B12-Resorption errechnet.
Fehlermöglichkeiten sind durch die individuell unterschiedliche Magen-Darm-Passage und durch verloren gegangene Faecesmengen gegeben. Die Frage, ob das im Dickdarm aus dem nicht resorbierten Radio-Vitamin B12 freigesetzte Radiokobalt noch resorbiert und damit eine höhere Vitamin B12-Resorption vorgetäuscht wird, konnte noch nicht beantwortet werden. Heinrich und Mitarbeiter fanden bei Anwendung des Radio-B12-FET bei Normalpersonen eine 55-88% (im Mittel 68%) betragende Resorption des Radio-Vitamins B12; Perniziosakranke resorbierten 0-18% (im Mittel 10%) und bei Wiederholung des Testes mit "intrinsic factor"-Zugabe 50-90% (im Mittel 70%)[38].

3. Radio-Vitamin B12-Reorptions-Blutkonzentrations-Test (Radio-B12-BKT).

Die Radioaktivität des intestinal resorbierten Radio-Vitamin B12-Anteiles der oralen Testdosis läßt sich auch im peripheren Blut bzw. Plasma nachweisen. Nach der oralen Zufuhr von 1 gamma Co^{56}-markierten Vitamin B12 hoher spezifischer Aktivität (5 Mikro-Curie) beginnt nach 4 Stunden ein Anstieg der Radio-B12-Plasmaaktivität, der nach 8-12 Stunden sein Maximum mit etwa 70 Ipm Co^{56}-B12/10 ml Plasma erreicht. Nach 2-4 Tagen ist die Radioaktivität im Plasma auf die Hälfte des Maximalwertes und nach 14 Tagen auf kaum noch meßbare Werte abgesunken[39].
Da die intestinale Radio-Vitamin B12-Resorption über etwa 12 Stunden protrahiert verläuft, treten immer nur geringe Mengen in den Blutkreislauf über. Zur Zeit der maximalen Radio-Vitamin B12-Konzentration im Plasma zirkulieren nur

wenige Prozent des resorbierten Radio-Vitamins B12 im Blutkreislauf[30].

Bei Perniziosapatienten kommt es 8-12 Stunden nach der oralen Belastung nur dann zu einem nennenswerten Anstieg der Radioaktivität im Plasma, wenn gleichzeitig ein "intrinsic factor"-Präparat gegeben wurde[30].

Der Radio-B12-BKT bringt schon nach 12 Stunden für die Diagnostik ausreichend genaue Ergebnisse[30].

4. Radio-Vitamin B12-Resorptions-Leberinkorporations-Test (Radio-B12-LIT).

Bei Gesunden findet nach oraler Gabe von 1-2 gamma Co^{60}-markierten Vitamin B12 (0,2-0,4 Mikro-Curie) eine Einlagerung des Radio-Vitamins B12 besonders in der Leber statt, die ihr Plateau nach 5-14 Tagen erreicht. Die Leberinkorporation ist bei Patienten mit perniziöser Anämie erst dann nachweisbar, wenn gleichzeitig ein "intrinsic factor"-Präparat verabfolgt wird[40].

Die Bestimmung der Radio-B12-Leberinkorporation geschieht durch Richtungsmessungen über mehreren Hautprojektionsflächen der Leber, nachdem das nicht resorbierte radioaktive Vitamin B12 aus dem Magen-Darm-Kanal (gemessen über der Haut des Abdomens) durchschnittlich innerhalb von 7 Tagen ausgeschieden worden ist[30]. Bleibt das Radio-Vitamin B12 durch Obstipation lange im Darm liegen, so kann dieses zu einer fehlerhaften Auswertung des Radio-B12-LIT führen. Auch das in anderen Organen abgelagerte radioaktive Vitamin B12 kann von den Strahlungsmeßgeräten mit erfaßt werden[30]. Die Reproduzierbarkeit der Meßobjekt-Strahlungsdetektor-Geometrie ist in der Praxis nicht ausreichend gegeben. Die Testdauer beträgt 5-8 Tage[30].

5. Radio-Vitamin B12-Resorptions-Gesamtkörperretentions-Test (Radio-B12-GRT)[30].

Dieser Test hat den Vorteil, daß man mit geringen Radioaktivitätsmengen auskommt (0,01-0,1 Mikro-Curie). Das Vorgehen ist relativ einfach, und die seitens des Patienten und des Pflegepersonals gegebenen Fehlermöglichkeiten

entfallen. Die Messungen werden mit Ganzkörper-Meßanordnungen durchgeführt. Zuerst wird als Radioaktivitätsgrundwert die Körpereigenradioaktivität des Patienten über 2 Minuten gemessen. Danach erhält der Patient die orale Testdosis; es findet eine zweite Messung statt, um einen Kontrollwert zu bekommen, da die gesamte Radioaktivität im Magen bzw. Dünndarm liegt. 7-14 Tage nach der oralen Belastung wird ein drittes Mal gemessen. Von diesem Ergebnis wird der Radioaktivitätsgrundwert abgezogen, und man erhält die Aktivität des in den Körper inkorporierten Radio-Vitamins B12. Der Radio-B12-GRT ist der einfachste, sicherste und empfindlichste Radio-B12-Test, jedoch stehen seiner routinemäßigen Anwendung die Kostspieligkeit der Meßanlage entgegen.

IV. Eigene Untersuchungen.

A. Methodik.

Die Untersuchung der Vitamin B12-Resorption wurde nach der von Schilling angegebenen Methode als Radio-Vitamin B12-Resorptions-Urinexkretions-Test durchgeführt. Die verwendete Testdosis enthielt 0,25 gamma Co^{58}-etikettiertes Vitamin B12 mit einer Ausgangsaktivität von 0,5 Mikro-Curie. Diese Menge liegt im physiologischen Bereich, sodaß eine höchst erreichbare Resorption gewährleistet ist. In allen Fällen wurde in 250 cm^3-Bechern mit der entsprechenden Menge Wasser ein Nullwert bestimmt, anschließend das Material hinzugegeben und die Radioaktivität der Testdosis gemessen. Verwendung fand ein Bohrlochkristall-Szintillationszähler, wobei die Becher auf das Bohrloch gestellt - letzteres war für die verwendeten Meßgefäße zu klein - und allseits mit Blei gegen die Außenwelt abgeschirmt wurden. Für die Bestimmung des Nullwertes wurde die Zeit von 4000 Impulsen und für die der Aktivität der Testdosis die Zeit von 40 000 Impulsen registriert.

Die Versuchspersonen tranken das Material morgens in nüchternem Zustand nach Entleerung der Harnblase. Nach

Ablauf von 2 Stunden wurde ihnen die sogenannte Sättigungs- und Ausschwemmungsdosis von 1 mg inaktivem Vitamin B12 intramuskulär injiziert. Danach durften sie frühstücken und mußten den Urin sorgfältig über 24 Stunden sammeln.

Damit die Bohrlochkristall-Meßgefäß-Geometrie in der oben beschriebenen Weise gewahrt bleibt, gelangte der Urin in den gleichen 250 cm^3-Bechern zur Messung. Der 24-Stunden-Urin wurde vorher gut gemischt, da man anderenfalls ein falsches Ergebnis gewinnt, weil die einzelnen Urinportionen entsprechend dem zeitlichen Abstand, zu dem sie nach Verabfolgung der Testdosis zur Ausscheidung gelangen, unterschiedliche Aktivitäten aufweisen. Vor jeder Urinmessung wurde ein Nullwert mit 250 cm^3 Wasser bestimmt. Sowohl bei der Nullwert- als auch bei der Urinaktivitätsbestimmung wurde die Zeit über 4000 Impulse gemessen. Die Aktivität der Urinprobe (250 cm^3) wurde auf die Gesamtmenge umgerechnet und in Prozent der Testdosis angegeben. Der Rechnungsgang soll an einem Beispiel wiedergegeben werden:

Verabfolgte Testdosis:

Nullwert (250 cm^3 Wasser):
4 000 Imp./8,03 Min. = 498 Imp./1 Min.

0,5 Mikro-Curie in 250 cm^3 Wasser:
40 000 Imp./1,27 Min. = 31 500 Imp./1 Min.

31 500 Imp./1 Min. - 498 Imp./1 Min.
= 31 002 Imp./1 Min. = 100%

Urin in 24 Stunden 1070 cm^3:

Nullwert (250 cm^3Wasser):
4 000 Imp./12,04 Min. = 332 Imp./1Min.

250 cm^3Urin:
4 000 Imp./3,32 Min. = 1205 Imp./1 Min.

1205 Imp./1 Min. - 332 Imp./1 Min. = 873 Imp./1 Min.

In 1070 cm^3 Urin = 3735 Imp./1 Min.
= 12,05% der Testdosis

Lag ein Ergebnis unter dem Bereich der Norm, so wurde nach Ablauf einer Woche der Test mit Zugabe von 100 mg (200 mg) "intrinsic factor" (Fa. Organon) wiederholt. Bei der Ausscheidung von normalen Aktivitätswerten wurde darauf verzichtet, weil in solchen Fällen die Wiederholung des Testes für die klinische Fragestellung ohne Nutzen ist.

In der Abbildung 6 ist der Ablauf des Schilling-Testes

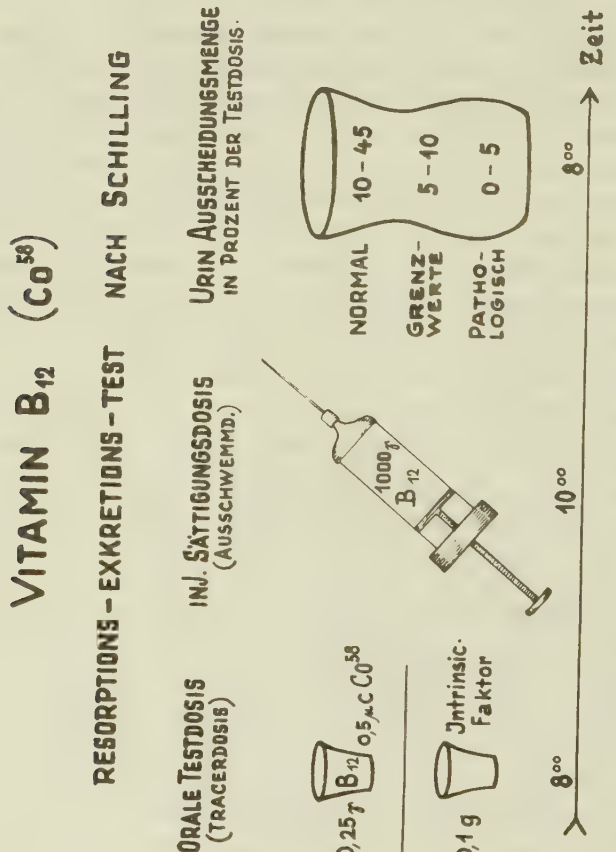


Abbildung 6

noch einmal aufgezeichnet.
Zunächst wurden 110 Patienten der internen und neurologischen Abteilung getestet, um mit der Methode vertraut zu werden. Davon schieden 12 Patienten, bei denen bereits vor dem Test die Diagnose "perniziöse Anämie" klinisch gesichert war, als Folge der stark verminderten Vitamin B12-Resorption nur 0,46% - 3,9% (im Mittel 1,83%) der Testdosis aus. Für Normalpersonen betrug der Ausscheidungswert 10,0% - 43,0% (im Mittel 18,3%) der Testdosis. 8 der getesteten Patienten wiesen etwas erniedrigte Werte zwischen 7,0% und 9,1% (im Mittel 7,9%) auf. Die Abbil-

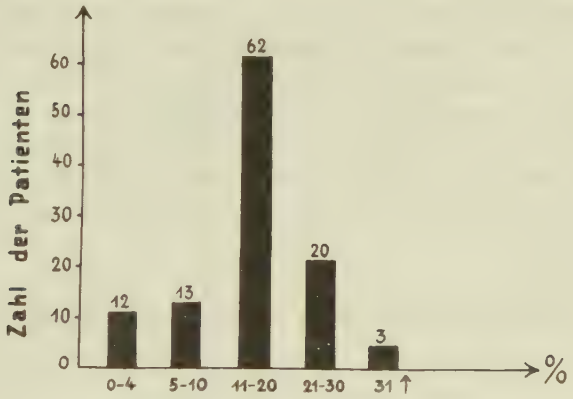


Abbildung 7

dung 7 gibt einen Überblick über die erzielten Ergebnisse.

B. Untersuchungen über die Vitamin B12-Resorption bei partieller Gastrektomie.

1. Krankengut.

Untersucht wurden 56 Patienten mit einer 2/3-Resektion des Magens. Die Patienten wurden je nach dem zeitlichen Abstand der Untersuchung vom Operationstermin in zwei Gruppen eingeteilt. Bei 25 Patienten lag zum Zeitpunkt

der Untersuchung die Operation 5-38 Tage und bei 31 Patienten 1-37 Jahre zurück. Vor der Durchführung des Schilling-Testes wurde darauf geachtet, daß die Patienten keine vitamin B12- oder "intrinsic factor"-haltigen Präparate bekommen haben. War dies der Fall, so wurde das Präparat abgesetzt und der Patient etwa 5-8 Tage danach getestet. In jedem Einzelfall wurde nachgeforscht, ob aus diagnostischen oder therapeutischen Gründen eine Behandlung mit anderen radioaktiven Substanzen vorausgegangen war. Bejahendenfalls wurde mit dem Schilling-Test entsprechend der Halbwertszeit des vorher verwendeten Isotops (meist J^{131}) gewartet. In Zweifelsfällen kann eine vorhergehende Aktivitätskontrolle einer Urintagesportion Klärung bringen. Lagen Ausscheidungsstörungen der Nieren vor, so wurde auf den Test verzichtet, da in solchen Fällen keine Aussage getroffen werden kann, ob eine eventuell verminderte Ausscheidung an radioaktivem Vitamin B12 auf eine Resorptionsstörung oder auf das Nierenleiden zurückzuführen ist.

2. Ergebnisse.

Die erzielten Resultate sind in der Abbildung 8 sowie in

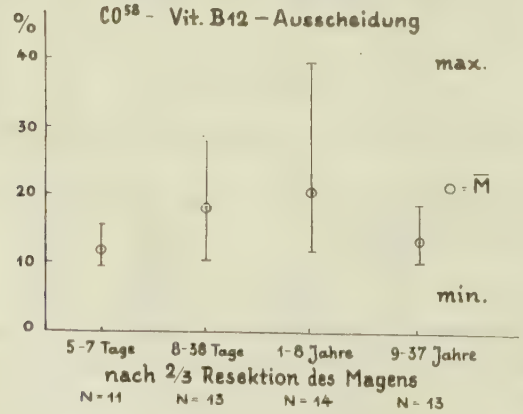


Abbildung 8

Tage post operationem:	Ergebnisse:
5	9,8%
5	10,0%
5	11,6%
5	14,4%
6	1,8%
6	10,9%
7	10,0%
7	10,3%
7	10,5%
7	12,8%
7	13,1%
7	15,3%
8	19,1%
10	18,0%
10	23,3%
11	17,9%
12	11,4%
12	14,2%
12	16,0%
15	21,2%
17	10,5%
23	16,1%
26	17,7%
26	29,1%
38	18,1%

Tabelle 1

Jahre post operationem:	Ergebnisse:
1	13,2%
1	37,0%
2	39,5%
3	17,0%
4	5,1%
4	11,6%
4	14,0%
5	21,3%
5	23,9%
5	26,7%
6	18,7%
7	5,1%
7	16,9%
8	5,3%
8	14,0%
8	14,7%
8	19,2%
9	13,8%
10	12,0%
10	12,9%
11	8,8%
11	12,5%
12	10,2%
13	12,0%
13	18,8%
16	10,0%
16	17,5%
18	16,3%
28	11,7%
32	17,8%
37	10,2%

Tabelle 2

den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt. Im einzelnen hat sich gezeigt, daß 24 Patienten der ersten Gruppe (5-38 Tage post operationem) Werte zwischen 9,8% und 29,1% mit einem Mittelwert von 15,05% der Testdosis im Urin ausgeschieden haben. Die Werte

liegen demnach alle im Bereich der Norm. Nur eine Patientin, bei der zum Zeitpunkt der Untersuchung die Operation 6 Tage zurücklag, wies mit 1,8% eine im pathologischen Bereich liegende Ausscheidung auf. In diesem Falle wurde 10 Tage später ein zweiter Schilling-Test unter Zugabe von 200 mg "intrinsic factor" durchgeführt. Dabei normalisierte sich das Ergebnis auf 10,3%.
Von den 31 Patienten der zweiten Gruppe (1 bis 37 Jahre post operationem) wiesen 27 normale Werte zwischen 10,0% und 39,5% (im Mittel 17,15%) der Testdosis auf. Bei 4 Patienten war die festgestellte Ausscheidung mit 8,8%, 5,3%, 5,1%, 5,1%subnormal. Die Operation lag bei den genannten Patienten 11, 8, 7 und 4 Jahre zurück. Die Wiederholung des Schilling-Testes mit einer Zugabe von jeweils 100 mg "intrinsic factor" ergab in zwei Fällen eine Erhöhung des Ausscheidungswertes von 8,8% auf 12,8% und von 5,1% auf 11,7%. In den anderen beiden Fällen konnte das Ergebnis kaum nennenswert verbessert werden und zwar von 5,1% auf 5,8% und von 5,3% auf 5,8%.

3. Diskussion der Ergebnisse.

In der Arbeit von I.Boll und H.G.Mehl wurde infolge eines Falles von 2/3-Magenresektion (Operation lag 1/2 Jahr zurück), der bei Durchführung des Schilling-Testes einen auf 4,9% erniedrigten Wert aufwies, die Frage aufgeworfen, ob der frisch operierte Magen zunächst keinen "intrinsic factor" bildet, und der Magenstumpf erst allmählich die "intrinsic factor"-Produktion wieder aufnimmt[2]. Auf Grund der im Rahmen meiner Arbeit gewonnenen Ergebnisse ist festzustellen, daß der nach einer 2/3-Resektion verbliebene Magenstumpf genügend "intrinsic factor" bildet, um das mit der Nahrung zugeführte Vitamin B12 in ausreichendem Maße zu resorbieren. Sowohl die Patienten, bei denen am Tage der Untersuchung die Operation nur kurze Zeit zurücklag, als auch die mit länger zurückliegendem Operationstermin zeigten in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle normale Werte. Nur eine Patientin der ersten Gruppe resorbierte das Radio-Vitamin B12 in pathologi-

schem und 4 Patienten der zweiten Gruppe in etwas vermindertem Maße. Bei der zuerst genannten Patientin kann die Ursache der Resorptionsstörung wohl in einem Mangel an "intrinsic factor" gesucht werden, da der mit "intrinsic factor"-Zugabe durchgeführte Schilling-Test das Ergebnis deutlich verbessern konnte. Das Operationspräparat zeigte bei der histologischen Untersuchung ein durch die Muskularis penetrierendes Ulcus chronicum und eine chronische follikuläre Gastritis. Eine perniziöse Anämie hatte die Patientin nicht; die gespeicherten Vitamin B12-Reserven genügten offenbar noch, um einen derartigen Zustand zu verhindern. W.Pribilla und H.-E.Posth wiesen darauf hin, daß bei Patienten mit einer Magenresektion nach Billroth II gelegentlich eine Resorptionsstörung für Vitamin B12 und unter Umständen eine daraus resultierende megaloblastische Anämie beobachtet wird[11]. Die Ursache dafür sehen sie in manchen Fällen in einer auf chronisch entzündlicher Basis entstandenen atrophischen Veränderung der Schleimhaut des Magenstumpfes. Wenn dies bei dem eben beschriebenen Fall zutrifft, so müßte man annehmen, daß die Patientin bereits vor der Operation eine gewisse Vitamin B12-Resorptionsstörung aufwies, und daß letztere durch die operative Entfernung eines Teiles des Magens erst eine hochgradige Form annahm. Die Operation lag zum Zeitpunkt der Untersuchung erst 6 Tage zurück, und die Patientin hatte schon vorher eine chronische Gastritis. In diesem Falle ist wohl damit zu rechnen, daß sich, sobald die Vitamin B12-Reserven in den verschiedenen Organen erschöpft sind, eine megaloblastische Anämie ausbildet. Das Blut- und Markbild dieser Patientin müßte daher laufend kontrolliert werden, damit die Diagnose rechtzeitig gestellt werden kann.
Bei den beiden Fällen der zweiten Gruppe, bei denen der Schilling-Test mit Zugabe eines "intrinsic factor"-Präparates das Ausscheidungsergebnis nur unwesentlich veränderte, liegt die Ursache der herabgesetzten Vitamin B12-Resorption sicher nicht in einer unzureichenden "intrinsic factor"-Produktion des Magenstumpfes. Der eine

Patient, bei dem eine Ausscheidung von 5,1% und bei Wiederholung des Testes von 5,8% der Testdosis festgestellt wurde, gab in der Anamnese einen paralytischen Ileus mit Anlage von mehreren Dünndarmanastomosen an. Der Kausalzusammenhang zwischen der verminderten Vitamin B12-Resorption und den Dünndarmresektionen ist in diesem Fall wohl gegeben, zumal der Patient als Zeichen einer allgemeinen Resorptionsstörung eine hochgradige Hypoproteinämie aufwies. Der andere Patient (1.Test: 5,3%; 2.Test: 5,8%) gab sowohl in der Anamnese als auch während des klinischen Aufenthaltes keinen Anhaltspunkt für die herabgesetzte Vitamin B12-Resorption. Die Röntgenuntersuchung des Magenstumpfes war unauffällig. Die beiden Patienten, die infolge des zweimal durchgeführten Schilling-Testes einen - wenn auch mäßigen - "intrinsic factor"-Mangel zeigten, hatten eine sich schon über mehrere Jahre erstreckende chronische Stumpfgastritis, sodaß darin vielleicht die Ursache der Vitamin B12-Resorptionsstörung liegt. Keiner der eben genannten 4 Patienten hatte eine megaloblastische Anämie, die resorbierte Vitamin B12-Menge reichte offenbar aus, um einen schweren Mangelzustand zu verhindern.

Aus den hier dargestellten Untersuchungen ergibt sich, daß Patienten mit einer 2/3-Resektion des Magens eine im normalen Bereich liegende Resorption des Vitamins B12 aufweisen und demzufolge in der Regel nicht auf eine laufende Behandlung mit diesem Vitamin angewiesen sind. Lediglich in bestimmten seltenen Ausnahmefällen kann eine Vitamin B12-Behandlung notwendig werden.

Die von I.Boll und H.G.Mehl[2] zur Diskussion gestellte Frage ist damit hinreichend beantwortet.

C. Untersuchungen über die Radio-Vitamin B12-Resorption nach parenteraler Applikation von inaktivem Vitamin B12.

1. Krankengut.

Untersucht wurden 51 Patienten - auf eine größere Anzahl

wurde verzichtet, da die erzielten Ergebnisse völlig konform waren - von neurologischen und internen Stationen. Der Schilling-Test wurde in allen Fällen zweimal durchgeführt. Zwischen den beiden Testen bekamen die Versuchspersonen verschieden hohe inaktive Vitamin B12-Dosen intramuskulär injiziert. 5 Patienten erhielten insgesamt 360 gamma Vitamin B12, verteilt auf 6 Einzeldosen von je 60 gamma Vitamin B12/die, 14 Patienten insgesamt 1800 gamma Vitamin B12, verteilt auf 6 Einzeldosen von je 300 gamma Vitamin B12/die, 10 Patienten insgesamt 2500 gamma Vitamin B12, verteilt auf 5 Einzeldosen von je 500 gamma Vitamin B12/die, 13 Patienten insgesamt 3000 gamma Vitamin B12, verteilt auf 6 Einzeldosen von je 500 gamma Vitamin B12/die und 9 Patienten insgesamt 4000 gamma Vitamin B12, verteilt auf 4 Einzeldosen von je 1000 gamma Vitamin B12/die, die nach Durchführung des ersten Schilling-Testes injiziert wurden.
Vor Beginn der Versuchsreihe wurden in allen Fällen die unter Abschnitt IV B 1 gegebenen Hinweise beachtet.

2. Ergebnisse.

In keinem der Fälle wies das zweite Ergebnis eine höhere Radioaktivitätsausscheidung im Urin auf als das erste. Bei den Versuchspersonen, die die geringsten Vitamin B12-Dosen bekommen hatten, unterschieden sich die beiden Ergebnisse nur geringfügig. Mit steigenden Vitamin B12-Mengen konnte jedoch eine immer größer werdende Differenz der Ausscheidungswerte beobachtet werden. In manchen Fällen sank das Ergebnis des zweiten Schilling-Testes sogar in einen absolut pathologischen Bereich ab. In der Tabelle 3 und der Abbildung 9 sind die Resultate zusammengestellt. Die Abbildung 9 gibt die Ergebnisse in der Weise wieder, daß die Mittelwerte der Aktivitätsausscheidungen des ersten Schilling-Testes als 100%, und die Mittelwerte der Aktivitätsausscheidungen nach den verschiedenen Vitamin B12-Belastungen dazu in Beziehung gesetzt wurden.

Parenterale Gabe
360 gamma B12:

1.Test:	2.Test:	Differenz:
10,0%	10,0%	0,0%
5,8%	5,8%	0,0%
17,8%	17,5%	0,3%
22,3%	21,9%	0,4%
16,0%	12,5%	3,5%

Parenterale Gabe
1800 gamma B12:

1.Test:	2.Test:	Differenz:
10,0%	8,9%	1,1%
15,4%	14,3%	1,1%
9,5%	8,0%	1,5%
20,0%	17,5%	2,5%
28,1%	25,6%	2,5%
18,8%	16,1%	2,7%
25,4%	22,2%	3,2%
21,6%	17,3%	4,3%
22,2%	17,8%	4,4%
28,7%	23,0%	5,7%
24,0%	17,4%	6,6%
13,0%	6,1%	6,9%
28,5%	20,0%	8,5%
38,8%	25,4%	13,4%

Parenterale Gabe
2500 gamma B12:

1.Test:	2.Test:	Differenz:
7,1%	6,1%	1,0%
11,1%	9,2%	1,9%
16,7%	13,0%	3,7%
12,1%	8,0%	4,1%
18,0%	12,6%	5,4%
25,0%	19,4%	5,6%
25,9%	20,3%	5,6%
19,6%	13,4%	6,1%
19,8%	22,2%	7,6%
23,8%	12,9%	10,9%

Parenterale Gabe
3000 gamma B12:

1.Test:	2.Test:	Differenz:
12,0%	10,0%	2,0%
17,4%	14,4%	3,0%
20,6%	16,3%	4,3%
11,9%	7,4%	4,5%
8,3%	3,5%	4,8%
13,5%	8,7%	4,8%
12,0%	6,8%	5,2%
16,3%	9,1%	7,2%
11,3%	1,7%	9,6%
16,0%	6,2%	9,8%
25,9%	13,0%	12,9%
25,4%	11,8%	13,6%
22,0%	2,9%	19,1%

Parenterale Gabe
4000 gamma B12:

1.Test:	2.Test:	Differenz:
15,7%	10,1%	5,6%
20,8%	13,9%	6,9%
19,0%	10,4%	8,6%
23,2%	14,6%	8,6%
18,7%	9,7%	9,0%
26,6%	17,0%	9,6%
12,9%	2,5%	10,4%
20,7%	9,1%	11,6%
23,1%	11,2%	11,9%

Tabelle 3

Abbildung 9

3. Diskussion der Ergebnisse.

Die unter Abschnitt IV C 1 angegebene Verteilung der einzelnen injizierten Vitamin B12-Dosen wurde so gewählt, um annähernd ein klinisches Behandlungsschema zu reproduzieren. Baker und Mollin injizierten dreimal 1mg Vitamin B12 (14 Stunden vor, gleichzeitig und 14 Stunden nach der oralen Belastung) und fanden dabei eine Herabsetzung der Radio-Vitamin B12-Resorption von 0,4 auf 0,06 gamma[41]. Durch Injektion von insgesamt 24 mg Vitamin B12 (6 tagelang 4 mg) sank die Radio-Vitamin B12-Urinexkretion um den Faktor 5-50 ab[42].

Man kann demnach die intestinale Resorption von Radio-Vitamin B12 durch vorherige parenterale Applikation hoher Dosen inaktiven Vitamins B12 hemmen. Dieser Effekt scheint von der Menge des injizierten Vitamins B12 abhängig zu sein und wurde von Heinrich als "parenterale Resorptionsblockade" bezeichnet. Nach Heinrich ist die Ursache nicht in einer stark erhöhten Serumkonzentration an proteingebundenem Vitamin B12 zu suchen, da die intestinale Radio-Vitamin B12-Resorption bei Patienten mit sehr hohen Konzentrationen an serumproteingebundenem Vitamin B12

(chronische myeloische Leukämie, akute Hepatitis) nicht beeinträchtigt ist. Infolge der Übersättigung des Organismus mit Vitamin B12 kommt es zu einer starken Vitamin B12-Exkretion über die Galle und die Magen- Darmschleimhaut in das Intestinum und dadurch zu einer Isotopenverdünnung der oralen Radio-Vitamin B12-Testdosis[43]. Weil offenbar die der Resorption angebotene Vitamin B12-Menge nun um ein vielfaches das physiologische Maß überschreitet, resultiert eine Herabsetzung der Radio-Vitamin B12-Resorption. Die "parenterale Resorptionsblockade" läßt sich noch 4 bis 5 Tage nach der letzten hoch dosierten Vitamin B12-Injektion nachweisen und ist nach etwa 7 bis 8 Tagen nicht mehr feststellbar[43].
Wie die in der Tabelle 3 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, kann der die Radio-Vitamin B12-Resorption hemmende Effekt so stark sein, daß der Schilling-Test ein absolut pathologisches Resultat zeigt, und damit eventuell das Vorliegen einer perniziösen Anämie vorgetäuscht wird.

Für die Praxis ergibt sich daraus, daß etwa 1 Woche vor Durchführung des Schilling-Testes bzw. einer der anderen genannten Radio-Vitamin B12-Teste eine extrem hoch dosierte Vitamin B12-Behandlung abgesetzt werden muß. Anderenfalls läßt sich keine exakte Aussage über das festgestellte Ergebnis treffen.

V. Zusammenfassung.

1. Die Radio-Vitamin B12-Resorption wurde mit Hilfe der Methode von R.F.Schilling untersucht. Normalpersonen schieden dabei Werte zwischen 10,0% und 43,0% (Mittelwert 18,3%) und Patienten mit perniziöser Anämie Werte zwischen 0,46% und 3,9% (Mittelwert 1,83%) der Testdosis im Urin aus.
2.Die Untersuchung von 56 Patienten mit einer 2/3-Resektion des Magens bei zeitlich unterschiedlich zurückliegendem Operationstermin ergab in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle normale Werte. Der Magenstumpf bildet demnach in der Regel genügend "intrinsic factor", um das

mit der Nahrung zugeführte Vitamin B12 in ausreichendem Maße zu resorbieren.

3. An Hand der Untersuchung von 51 Patienten konnte gezeigt werden, daß die parenterale Applikation hoher Dosen inaktiven Vitamins B12 die intestinale Resorption von Radio-Vitamin B12 beeinträchtigt. Etwa 7 Tage vor Durchführung eines der verschiedenen Radio-Vitamin B12-Teste muß daher eine Behandlung mit größeren Mengen dieses Vitamins abgesetzt werden.

Literaturangaben:

1) Pribilla und Mitarb.: Kli. Wo. 36, 218 (1958)
2) Boll I., Mehl H.G.: Dtsch. Med. Wschr. 16,789 (1959)
3) A.v.Domarus, H.Frh.v.Kress: Grundr. der inn. Med., Springer Verl., 22. Aufl., 314 (1957)
4) Minot und Murphy: J. Amer. Med. Ass. 87, 470 (1926)
5) Castle und Townsend (1929): zit. bei Pribilla W. u. Posth H.E. Schw. Med. Wschr. 52, 1306 (1958)
6) Rickes E.L. u. Mitarb.: Science 107, 396 (1948)
7) Leuthardt F.: Lehrb. der physiolog. Chemie, Walter de Gruyter & Co., 14. Aufl., 802 (1959)
8) Heinrich H.C. u. Lahann H.: Z. Naturforschg. 7b, 417 (1952)
9) Pfiffner u. Mitarb. (1951/52), Ford u. Mitarb. (1951/52): zit. bei Heinrich u. Lahann, Ztschr. für Vit.- Horm.- u. Fermentforschg. 6, 126 (1954)
10) Heinrich H.C. u. Lahann H.: Ztschr. für Vit.- Horm.- u. Fermentforscng. 6, 126 (1954)
11) Pribilla W. u. Posth H.E.: Schw. Med. Wschr. 52, 1306 (1958)
12) Glass G.B.J. u. Mitarb.: Ref. in Ber. Physiol. 156, 5/6 330 (1953)
13) Spray G.H.: Biochem. J. 5o, 587 (1952)
14) Glass G.B.J., Boyd L.J., Rubinstein M.A., Svigals C.: Science 115, 101 (1952)
15) Germann W.: Ärztl. Forschg. 9,87 (1955)
16) Heinrich H.C.: Kli. Wo. 32, 205 (1954)
17) Ostrowski u. Mitarb. (1954): zit. bei Heinrich und Lahann, Ztschr. für Vit.- Horm.- und Fermentforschg. 6, 126 (1954)
18) Heinrich H.C. u. Lahann H. (1952): zit. bei Heinrich und Lahann, Ztschr. für Vit.- Horm.- u. Fermentforschg. 6, 126 (1954)
19) Wolf R. u. Mitarb.: Ref. in Ber. Physiol. 156 5/6, 328 (1953)
20) Finch St. C.: Med. Clin. North. America 36, 5, 1223 (1952)

21) Kantzsch E.: Medizinische 48, 1546 (1953)
22) Swendseid M.E., Bethell F.A., Ackermann W.W.: J. Biol. Chem. 190, 791 (1951)
23) Bennett B.: J. Biol. Chem. 187, 751 (1950)
Jukes u. Mitarb.: Arch. Biochem. 25, 453 (1950)
24) Johnson u. Mitarb.: Arch. Biochem. Biophys. 54, 467 (1955), Chang u. Johnson: Arch. Biochem. Biophys.55, 151 (1955)
25) Hevesy: zit. bei Kleinsorge H. Ztschr. inn. Med. 23, 1093 (1952)
26) H.Stobbe: Hämatolog. Atlas, Akadem. Verlag Berlin, 58/59 (1959)
27) Heinrich H.C., Goldeck H., Appuhn E. u. Bauer H.: Vitam. u. Horm. 7, 157 (1956)
28) Tanaka S., Sawada Y., Yamamoto T. (1952): zit. bei Heinrich u. Lahann, Ztschr. für Vit.- Horm.- Fermentforschung 6, 126 (1954)
29) Anderson R.L., Delabarre Y.: J. Am. Chem. Soc. 73, 4051 (1951)
30) Schwiegk H., Turba F.: Künstl. radioakt. Isotp. in Physiol. Diagn. u. Therap. Springer-Verl. 2. Aufl. Band II 660 (1961)
31) Schilling R.F.: J. Lab. clin. Med. 42, 860 (1953)
32) Best W.R., Landmann W.A.: J. Haematol. 11, 352 (1956)
33) Watkin D.M., Barrows C.H., Chowand B.F. and Schock N.W. Fed. Proc. 13, 161 (1954)
34) Bull F.E., Campbell D.C., Owen C.A.: Fed. Proc. 15, 509 (1956)
35) Miller A., Corbus H.F. and Sullivan J.F.: J. Haematol. 12, 347 (1957)
36) Schilling R.F., Clatanoff D.V. and Korst D.R.: J. Lab. clin. Med. 45, 926 (1955)
37) Heinle R.W., Welch A.D., Scharf V., Mearcham G.L. and Prusoff W.H.: Trans. Ass. Amer. Physicians 65, 214 (1952)
38) Heinrich u. Mitarb. (1959): zit. bei Schwiegk H., Turba F.: Künstl. radioakt. Isotp. in Physiol. Diagn. u. Therap. Springer-Verl. 2.Aufl. Bd.II 660 (1961)

39) Booth C.C., Mollin D.L.: Brit. J. Haematol. 2, 223 (1956)
40) Glass G.B.J., Stephanson L.: Proc. Soc. exp. Biol. (NY) 86, 522 (1954)
41) Baker S.J. and Mollin D.L.: Brit. J. Haematol. 1, 46 (1955)
42) Ellenbogen L., Williams W.C., Rabiner S.F. and Lichtman H.C.: Proc. Soc. exp. Biol. (NY) 89, 357 (1955)
43) Heinrich (1956): zit. bei Schwiegk H., Turba F.: Künstl. radioakt. Isotp. in Physiol. Diagn. u. Therap. Springer-Verl. 2. Aufl. Band II 660 (1961)

Für die Überlassung des Themas

bin ich

Herrn Professor Dr. Walter Frommhold

zu großem Dank verpflichtet

Lebenslauf.

Am 15.12.1938 wurde ich, Hans-Ulrich Pesch, als Sohn des Arztes Dr. med. Hans-Ulrich Pesch und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Degler, in Merseburg geboren. Von 1944 bis 1952 besuchte ich die Volksschulen in Reichenberg, Walternienburg (Kreis Zerbst) und in Merseburg. 1952 kam ich in Merseburg auf die Oberschule, wo ich im Jahre 1956 das Abitur mit dem Urteil "gut" bestand. Noch im gleichen Jahre ließ ich mich an der Medizinischen Fakultät, Fachrichtung Humanmedizin, der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Halle/S. immatrikulieren. 1957 legte ich dort den naturwissenschaftlichen Teil der ärztlichen Vorprüfung ab. Das an den Universitäten Mitteldeutschlands obligatorische Fach "Gesellschaftswissenschaft", das auch im Rahmen des Vorphysikums geprüft wurde, bestand ich nicht und wurde daraufhin vom weiteren Studium ausgeschlossen. Deshalb siedelte ich in die Bundesrepublik über und nahm vom Dezember 1957 bis zum April 1958 in Heidelberg an einem Sonderkursus für Abiturienten aus Mitteldeutschland teil. Nachdem ich die Sonderprüfung für die Anerkennung meines in Merseburg erworbenen Reifezeugnisses bestanden hatte, setzte ich zum Sommersemester 1958 an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz mein in Halle begonnenes Medizinstudium fort. Im Herbst 1959 bestand ich dort die ärztliche Vorprüfung mit dem Urteil "gut". Das erste klinische Semester absolvierte ich noch in Mainz und ging danach im Mai 1960 an die Freie Universität in Berlin, wo ich im Frühjahr 1963 die ärztliche Prüfung mit der Note "gut" bestand. Seit dem 1. Juni 1963 bin ich als Medizinalassistent in einem Berliner Krankenhaus tätig.

Berlin, den 15.6.1963